

**PENGARUH PEMBERIAN SARI TEMPE KEDELAI
HITAM (*Glycine max* (L.) Merr.) HASIL FERMENTASI
Rhizopus oligosporus PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL FIBROSIS HEPAR TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDA DAN AKTIFITAS
ALKALINE PHOSPHATASE**

SKRIPSI

Oleh:

BELLA KUSUMA DEWI

135130101111073



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN SARI TEMPE KEDELAI HITAM (*Glycine max* (L.) Merr.) HASIL FERMENTASI *Rhizopus oligosporus* PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL FIBROSIS HEPAR TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA DAN AKTIFITAS ALKALINE PHOSPHATASE

Oleh:

BELLA KUSUMA DEWI
NIM. 135130101111073

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

pada tanggal

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh

gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS

NIP. 19520412 198002 1 001

drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Bella Kusuma Dewi

NIM : 135130101111073

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar Terhadap Kadar Malondialdehida Dan Aktifitas Alkaline Phosphatase
Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, makasaya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,

Yang menyatakan,

(Bella Kusuma Dewi)

NIM. 135130101111073

**PENGARUH PEMBERIAN SARI TEMPE KEDELAI HITAM (*Glycine max* (L.)
Merr.) HASIL FERMENTASI *Rhizopus oligosporus* PADA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) MODEL FIBROSIS HEPAR TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDA DAN AKTIFITAS ALKALINE
PHOSPHATASE**

ABSTRAK

Fibrosis hepar merupakan respon penyakit hepar kronis yang ditandai oleh produksi berlebih matriks ekstraseluler, sehingga berdampak pada perubahan struktur jaringan hepar. CCl₄ adalah senyawa hepatotoksik yang dapat menimbulkan stress oksidatif pada hepar sehingga memicu perubahan struktur dari membran sel hepatosit. Kedelai hitam yang terfermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* akan menghasilkan isoflavon lebih tinggi karena terjadi reaksi metabolisme secara anaerob serta menghasilkan enzim fibrinolitik yang dapat menghidrolisis benang fibrin, sehingga berpotensi sebagai terapi alternatif fibrosis hepar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) *Merr.*) terhadap kadar MDA dan ALP pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar hasil induksi CCl₄. Penelitian ini menggunakan lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diinduksi CCl₄ 20% tiap dua kali perminggu selama dua minggu, kemudian CCl₄ 25% tiap dua kali seminggu selama empat minggu sebanyak 0,2 mL/100gBB, kelompok terapi 1, 2 dan 3 dengan sari tempe kedelai hitam dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB sebanyak 2 mL melalui per oral. Parameter yang diamati adalah kadar MDA dan ALP menggunakan metode spektrofotometer dan dianalisis secara statistik kuantitatif dengan *Oneway ANOVA* dilanjutkan uji *Tukey*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi sari tempe kedelai hitam secara sangat signifikan ($p < 0,01$) menurunkan kadar MDA dan aktivitas ALP pada tikus model fibrosis hepar. Dosis efektif terapi adalah 800 mg/KgBB dapat menurunkan kadar MDA sebesar 56,3% dan aktivitas ALP sebesar 52,2% dari kontrol positif. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu sari tempe kedelai hitam dapat dijadikan terapi untuk menurunkan kadar MDA dan aktivitas ALP pada tikus model fibrosis hepar.

Kata kunci: Tempe kedelai hitam, fibrosis hepar, MDA, ALP.

**THE EFFECT OF BLACK SOYBEAN TEMPE (*Glycine Max (L.) Merr.*)
ESSENCE RESULT OF FERMENTATION *Rhizopus oligosporus* IN RAT
(*Rattus norvegicus*) HEPATIC FIBROSIS MODEL TO MALONDIALDEHIDA
LEVELS AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY**

ABSTRACT

Liver fibrosis is a response to chronic liver disease characterized overproduction of extracellular matrix, so the impact on changes in the structure of the liver tissue. CCl₄ is a hepatotoxic model compound that can cause oxidative stress in the liver to trigger a structural change of the hepatocyte cell membrane. Fermented black soybean (*Glycine max (L.) Merr.*) derived from *Rhizopus oligosporus* will generate higher isoflavone because anaerobic metabolic reaction and produce fibrinolytic enzyme that can hydrolyze fibrine substrate, so liquid extract of fermented black soybean can be potential therapy of liver fibrosis. This research aimed to determine the effect of fermented black soybean extract on MDA and ALP in rats (*Rattus norvegicus*) liver fibrosis induced by CCl₄. This study was conducted using completely randomized design (CRD), using a rat, which consists of five (5) groups: negative control group, positive control group 20% CCl₄ induced twice weekly for 2 weeks, then CCl₄ 25% induced twice weekly for 4 weeks with volume 0.2 mL/100gBB every two times a week for two weeks later with a volume of 0.1 mL / 100gBW, and therapies group member 1,2 and 3 with given fermented black soybean extract dose 200 mg/kgBW, 400 mg/kgBW, 800 mg/kgBW with volume 2mL per-orally. Measurement of MDA and ALP levels was conducted using spectrophotometer methods and analyzed statistically quantitative with *Oneway* ANOVA then continued test of *Tukey*. The results showed that fermented black soybean significantly ($p < 0,01$) decreased MDA levels and ALP activity in mouse hepatic fibrosis model. Effective dose for therapies of 800 mg/KgBW can decrease MDA level for 56,3% and ALP activity for 52,2% from positive control. The conclusion of the study was fermented black soybean extract can be used as therapy to decrease MDA level and ALP activity in mouse model of hepatic fibrosis.

Keywords: Fermented black soybean, liver fibrosis, MDA, ALP.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Skripsi yang berjudul “**Pengaruh Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar Terhadap Kadar Malondialdehida dan Aktifitas Alkaline Phosphatase**”. Shalawat beriring salam semoga tetap tercurahkan kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan, Program Studi Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih khususnya kepada:

1. Prof. Dr. Drh. Aulanni'am, DES, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan atas segala bantua dan dukungan terhadap tiada henti kepada mahasiswa FKH UB tercinta.
2. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS, selaku dosen pembimbing pertama yang telah berkenan memberikan bimbingan, waktu, kesabaran, motivasi dan bantuan dalam penulisan proposal Skripsi ini.
3. drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech, selaku dosen pembimbing kedua yang telah berkenan memberikan bimbingan, waktu, kesabaran, motivasi dan bantuan dalam penulisan proposal Skripsi ini
4. drh. Dian Vidiastuti, M. Si dan drh. Ahmad Fauzi, M. Sc sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan masukan dan saran yang membangun.
5. Ayahanda Bapak Samino, Ibunda Kasih Lestari, Kedua kakak Anik Retno Asih dan Dodit Rusdiyanto, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, kasih sayang dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis.

6. Hana Razanah, Venna Oktavia Anggraini, dan Eki Bahtiar selaku Kelompok Penjaga Hepar yang mengajarkan arti kesabaran, keikhlasan, serta kebersamaan.
7. Sahabat-sahabat tersayang Aminatus Sholihah, S. Si, Fahmi Rizaldi, Luh Putu S. dan Lia Mulyaningtyas atas segala dukungan, bantuan dan pemberi semangat yang tidak akan terlupakan kepada penulis.
8. Teman-teman Dexa yang mengisi hari-hari penulis dengan keceriaan,
9. Teman-teman seperjuangan Kolega FKH UB angkatan 2013, dan kakak-kakak tingkat yang selalu memberikan bantuan tenaga dan pikiran.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan proposal ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini penulis merasa masih banyak kekurangan pada teknis penulisan maupun materi, mengingat akan kemampuan yang dimiliki penulis. Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna sehingga diharapkan dapat memberikan masukan dari berbagai pihak untuk penulisan yang lebih baik. Semoga tugas akhir ini dapat memberikan manfaat karena pengalaman adalah guru terbaik.

Malang, 28 Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Hepar	7
2.1.1 Anatomi Hepar.....	8
2.1.2 Fisiologi Hepar.....	8
2.2 Fibrosis Hepar	9
2.3 Senyawa <i>Carbon Tetrachloride</i> (CCl ₄).....	11
2.4 Patomekanisme Fibrosis oleh Senyawa CCl ₄	12
2.5 <i>Malondialdehida</i> (MDA)	13
2.6 <i>Alkaline phosphatase</i> (ALP)	14
2.7 Kadar SGOT dan SGPT Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	15
2.8 Kedelai Hitam (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.).....	16
2.9 Bahan Aktif Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i>	18
2.10 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	21
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	23
3.1 Kerangka Konsep	23
3.2 Hipotesis Penelitian.....	26
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	27
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	27
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	27
4.2.1 Alat Penelitian	27

4.2.2 Bahan Penelitian	28
4.3 Tahap Penelitian	28
4.3.1 Sampel Penelitian	28
4.3.2 Rancangan Penelitian	29
4.3.3 Variabel Penelitian	30
4.4 Prosedur Kerja	31
4.4.1 Persiapan Hewan Coba	31
4.4.2 Pembuatan Hewan Model Fibrosis Hepar	31
4.4.3 Penyiapan Inokulum	31
4.4.4 Pembuatan Media Tempe Kedelai Hitam	31
4.4.5 Proses Fermentasi Tempe	32
4.4.6 Pembuatan Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i>	32
4.4.7 Uji Cakram Fibrin	33
4.4.8 Identifikasi Profil Isoflavon	33
4.4.9 Pemeriksaan Kadar SGPT-SGOT Untuk Penentuan Fibrosis Hepar	34
4.4.10 Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i> sebagai Terapi	34
4.4.11 Pengambilan Sampel Serum Darah	35
4.4.12 Pembuatan Kurva Baku MDA	35
4.4.13 Pengukuran Kadar MDA	36
4.4.14 Pengukuran Kadar ALP	36
4.5 Analisa Data	37
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
5.1 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Fibrosis Hepar Hasil Induksi CCl ₄	38
5.2 Pengaruh Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i> Terhadap Kadar MDA	40
5.3 Pengaruh Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i> Terhadap Aktivitas ALP	44
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	49
6.1 Kesimpulan	49
6.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	29
5.1 Rasio Kadar SGOT dan SGPT	38
5.2 Rata-Rata Kadar MDA Tikus.....	40
5.3 Rata-Rata Aktivitas ALP Tikus	44



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Anatomi Hepar.....	8
2.2 Skema Pembentukan MDA dari PUFA	14
2.3 Kedelai Hitam	17



LEMBAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional.....	56
2. Determinasi Kedelai Hitam.....	57
3. Keterangan Varietas Kedelai Hitam dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi.....	58
4. Perhitungan Larutan dan Induksi CCl ₄	59
5. Penyiapan Inokulum.....	60
6. Pembuatan Media Biji Kedelai Hitam	60
7. Proses Fermentasi Tempe	60
8. Pembuatan Sari Kedelai Hitam (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i>	60
9. Uji Cakram Fibrin	61
10. Identifikasi Profil Antioksidan.....	61
11. Perhitungan Dosis dan Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam	62
12. Pengukuran Kadar SGPT-SGOT	63
13. Prosedur Pengukuran Kadar MDA	64
14. Pengukuran Kadar ALP	66
15. Hasil LC-MS	67
16. Hasil Uji Cakram Fibrin.....	68
17. Laik Etik No. 745-KEP-UB	69
18. Fibrosis Hepar dengan Pewarnaan <i>Masson trichrome</i>	70
19. Pengukuran Kadar MDA Tikus	71
20. Hasil Uji Statistika Kadar MDA	73
21. Hasil Aktivitas ALP Tikus	76
22. Hasil Uji Statistika Aktivitas ALP	77
23. Dokumentasi Proses Pembuatan Tempe	80

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

ECM	: <i>extracellular matrix</i>
CCl ₄	: <i>carbon tetrachloride</i>
MDA	: <i>Malondialdehida</i>
ALP	: <i>Alkaline phosphatase</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
mL/100g BB	: milliliter per 100gram berat badan
mL/kgBB	: milliliter per kilo gram berat badan
%	: Persen
HSC	: <i>hepatic stellate cell</i>
MMP	: <i>matrix of metalloproteinase</i>
HBV	: Hepatitis B Virus
HCV	: Hepatitis C Virus
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
CCl ₃ ⁻	: triklorometri
CCl ₃ O ₂ ⁻	: triklorometilperoxi
PUFAs	: <i>polyunsaturated fatty acid</i>
O ₂ ⁻	: anion superoksida
H ₂ O ₂	: hidrogen peroksida
O ₂	: oksigen
SGOT	: <i>Serum Glutamic Oxaloasetic Transaminase</i>
SGPT	: <i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i>
ALT	: <i>Alanine Aminotransferase</i>
AST	: <i>Aspartat Aminotransaminase</i>
mg/g	: milligram per gram
β-glukosidase	: beta-glukosidase
NaCl	: natrium klorida
b/v	: berat per volume
°	: Derajat
C	: Celcius
TCA	: <i>Tricarboxylic Acid</i>
TBA	: <i>Thiobarbituric Acid</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
rpm	: <i>rotation per minutes</i>
PBS	: <i>Phosfat Buffer Saline</i>
mL	: Mililiter
nm	: nanometer
μl	: microliter
μmol	: micromol
ANOVA	: <i>analysis of varian</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hepar merupakan organ metabolik terbesar dan sebagai pabrik biokimia utama didalam tubuh. Hepar dapat mengalami kerusakan apabila kerjanya berlebih, karena sebagian *toxic* akan memasuki tubuh melalui gastrointestinal dan dibawa melalui vena porta hingga ke hepar. Beberapa kerusakan pada hepar yaitu perlemakan hepar, nekrosis, fibrosis hingga berlanjut menjadi sirosis hepar (Price and Wilson, 2006; Klaassen, 2008). Fibrosis hepar merupakan akumulasi berlebih matriks ekstraseluler akibat respon terhadap penyakit hepar yang bersifat kronis. Penentuan derajat fibrosis berperan penting dalam hepatologi karena penyakit hepar kronis dapat berkembang menjadi fibrosis dan berakhir menjadi sirosis (Bataller and Branner, 2015).

Fibrosis hepar dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti virus, bakteri, fungi dan obat-obatan serta senyawa toksik. Induksi dengan pemberian CCl_4 juga dapat menghasilkan perubahan yang serupa dengan perubahan yang terjadi pada jaringan hepar yang diakibatkan dari berbagai kelainan hepar (Anom dan Wibawa, 2010). *Carbon tetrachloride* merupakan salah satu senyawa toksik yang apabila diinduksikan dapat menyebabkan nekrosis didalam sentrolobuler hepar (Weber, *et al.*, 2003). Metabolisme *Carbon tetrachloride* (CCl_4) oleh enzim sitokrom P-450 akan menjadi senyawa radikal yaitu triklorometil (CCl_3^\cdot). Kemudian akan bereaksi dengan oksigen (O_2) dan

menghasilkan triklorometilperoksi radikal ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$) (Recknagel, *et al.*, 1989). Radikal bebas dapat meningkatkan peroksidasi lipid yang kemudian akan menjadi sebuah produk yang berupa *malondialdehida* (MDA). Uji MDA dapat digunakan untuk mengukur peroksidasi yang terjadi pada membran lipid (Latifa, 2015). Sel hepatosit yang telah rusak oleh radikal menyebabkan kenaikan kadar ALP dalam serum. *Alkaline phosphatase* (ALP) yang terdapat pada sel hati juga merupakan salah satu indikasi dari kerusakan hepatoseluler (Sharma, *et al.*, 2012).

Pada saat ini terapi untuk fibrosis hepar yang diberikan masih terbatas efikasi. Selain itu, sebagian besar terapi untuk penyakit hepar kronis hanya menargetkan agen penyebab (Bataller and Branner, 2015). Peluang dari pemulihan hepar jika berdasarkan tahap kerusakannya bahwa pada *fatty liver* memiliki peluang pemulihan sebesar 50%-90%, *liver fibrosis* sebesar 20%-30%, dan *cirrhosis* sebesar 2%-5% (Hubscher, 2006). Berdasarkan hal tersebut pertimbangan menggunakan obat herbal dapat menjadi salah satu alternatif pengobatan. Salah satunya adalah antioksidan yang dapat digunakan sebagai terapi pada penyakit hepar melalui mekanisme pertahanan dari radikal bebas, ROS serta proses inflamasi (Krisnansari, dkk, 2014).

Kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr) mempunyai kandungan fenolik, tanin, antosianin dan isoflavon serta aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibanding kedelai kuning. Kandungan antioksidan pada kedelai hitam diketahui 15 kali lebih tinggi dibanding kedelai kuning (DPPH *scavenging capacity* kedelai kuning dan hitam berturut-turut 1,40 dan 17,58 μmol per gram) (Xu and Chang, 2007). Kedelai yang terfermentasi jamur *Rhizopus*

oligosporus, seperti tempe menunjukkan kandungan isoflavon dan derivatnya lebih tinggi dari pada biji kedelainya (Ralston, 2005). Kandungan isoflavon yang lebih tinggi diakibatkan reaksi metabolisme secara anaerob dari jamur *Rhizopus oligosporus* yang mengubah senyawa flavonoid menjadi isoflavonoid (Atun, 2009). Selain mengandung antioksidan, tempe *Rhizopus oligosporus* diketahui mengandung aktivitas fibrinolitik yang diuji menggunakan media *skim milk* agar dan fibrin *plate* (Poernomo, dkk, 2015).

Berdasarkan hal tersebut diharapkan penelitian ini dapat mengetahui sari kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dapat digunakan sebagai kandidat terapi fibrosis hepar yang mampu menurunkan peroksidase lipid sehingga kadar MDA (*Malondialdehida*) dan aktivitas ALP (*Alkaline Phosphatase*) akan menurun.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

1. Apakah terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dapat mempengaruhi kadar MDA (*Malondialdehida*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄?
2. Apakah terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dapat mempengaruhi aktivitas ALP (*Alkaline*

Phosphatase) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar umur 2 bulan dengan berat 150-200 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan coba sudah terdapat sertifikat Laik Etik No. 745-KEP-UB (**Lampiran 16**).
2. Biji kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) varietas DETAM-1 yang digunakan berasal dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, Malang (**Lampiran 3**) dan telah mendapat keterangan determinasi dari UPT Materia Medica, Batu (**Lampiran 2**).
3. Proses fermentasi dilakukan dengan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 yang diperoleh dari Laboratorium PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan diencerkan hingga konsentrasi 10%.
4. Pembuatan sari dilakukan dengan menghaluskan tempe kedelai hitam dengan aquadest yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
5. Induksi fibrosis hepar dilakukan pada hewan coba dengan pemberian CCl₄ konsentrasi 20% secara intraperitoneal dengan volume 0,2 mL/100gBB tiap

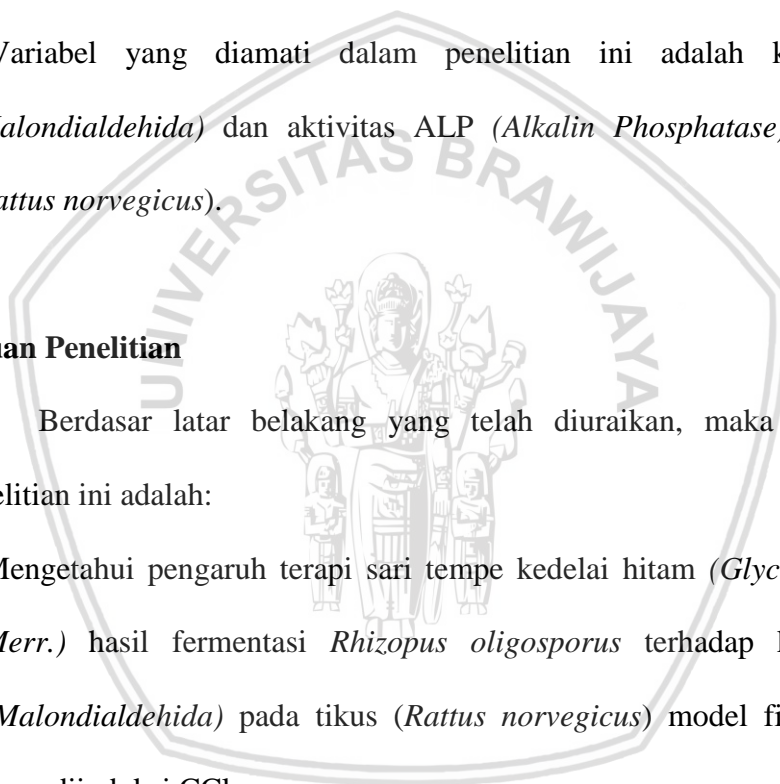
dua kali perminggu selama dua minggu pertama. Empat minggu berikutnya, dilakukan induksi CCl_4 25% dengan volume 0,2 mL/100gBB tiap dua kali perminggu (Costandinou, *et al.*, 2005).

6. Terapi sari tempe kedelai hitam diberikan pada hewan coba dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB diberikan secara per-oral sebanyak 2 mL setiap hari satu kali selama 14 hari.
7. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar MDA (*Malondialdehida*) dan aktivitas ALP (*Alkaline Phosphatase*) pada tikus (*Rattus norvegicus*).

1.4 Tujuan Penelitian

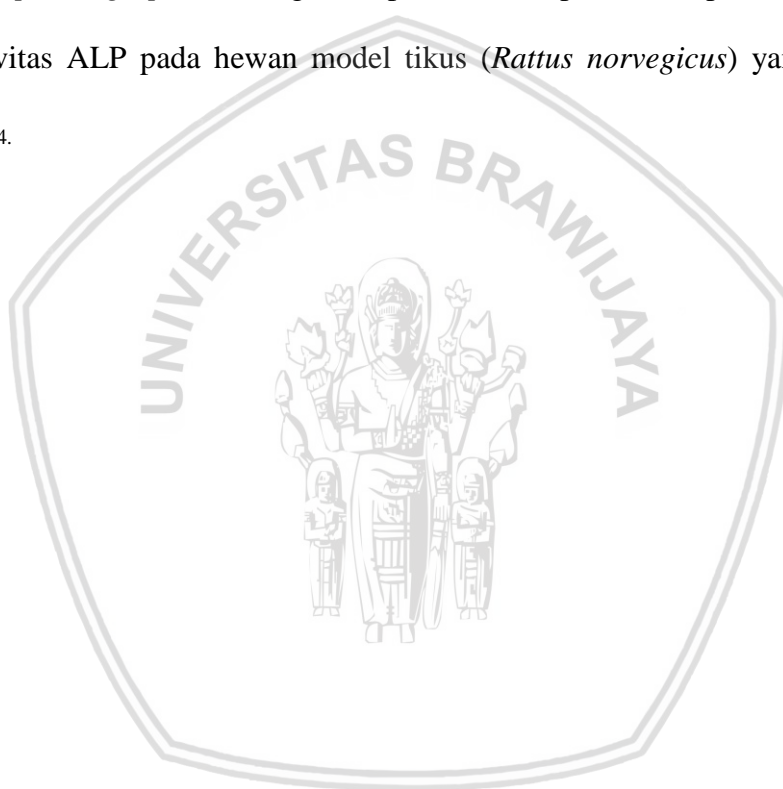
Berdasar latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* terhadap kadar MDA (*Malondialdehida*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl_4 .
2. Mengetahui pengaruh terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* terhadap aktivitas ALP (*Alkaline Phosphatase*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl_4 .



1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi dalam kajian ilmiah tentang manfaat dari sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus*. Adanya penelitian ini dapat mengetahui potensi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* sebagai terapi fibrosis hepar terhadap kadar MDA dan aktivitas ALP pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi CCl₄.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

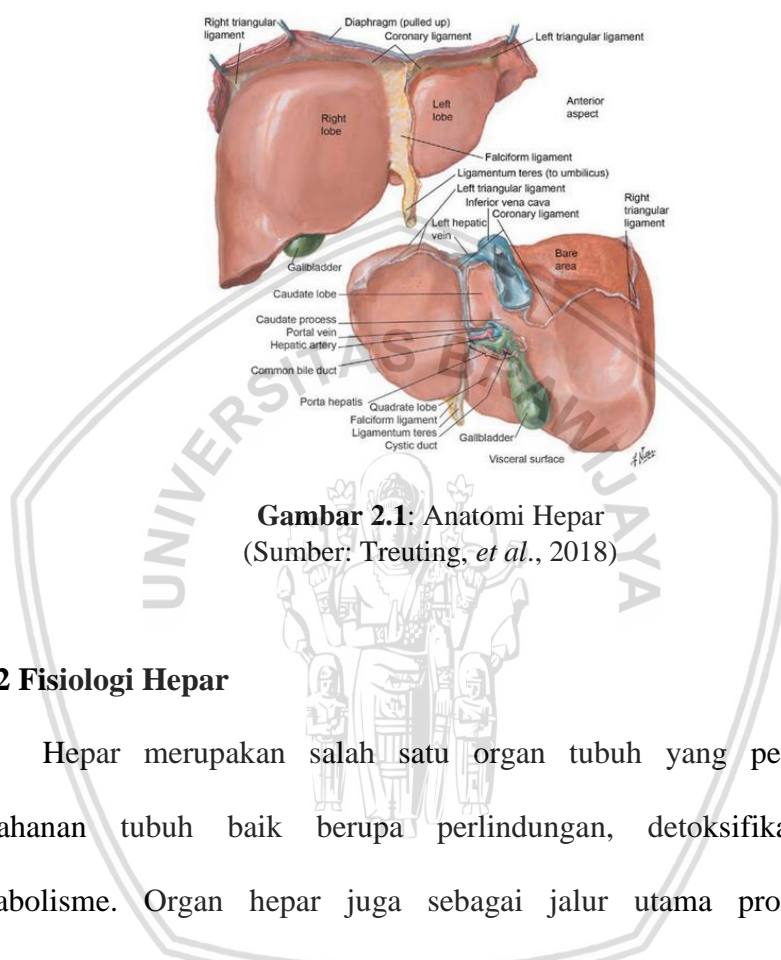
2.1 Hepar

2.2.1 Anatomi Hepar

Hepar merupakan salah satu organ terbesar dalam tubuh yang terletak pada kuadran kanan atas abdomen dibawah diafragma dan dilindungi oleh cartilago costalis. Hepar berwarna merah coklat, sangat vaskuler dan lunak. Hepar dibungkus oleh simpai tipis jaringan ikat (kapsula *Glisson*) yang menebal di hilum dan melekat longgar pada seluruh permukaan hepar kecuali area porta hepatica (Juhryyah, 2008). Hepar terbagi menjadi dua lobus, yaitu lobus dexter yang berukuran besar dan lobus sinister yang berukuran kecil, yang dibagi oleh perlekatan ligamentum peritoneal dan ligamentum falciform. Lobus dexter terbagi lagi menjadi dua, yaitu lobus quadratus dan lobus caudatus karena terdapat vesica biliaris, fissura ligamenti teretis, V. cava inferior, dan fissura ligamenti venosi (Snell, 2006).

Daerah tempat keluar masuk pembuluh darah pada hepar dikenal dengan nama hilus atau porta hepatis. Pembuluh yang terdapat pada daerah ini antara lain vena porta, arteri hepatica propria, dan terdapat duktus hepaticus dextra dan sinistra. Vena pada hepar yang membawa darah keluar dari hepar menuju vena cava inferior adalah vena hepatica. Sedangkan, pembuluh darah vena porta dan arteri hepatica alirannya menuju pada porta hepatica (Sherwood, 2009). Kemudian darah mengalir di sekitar tepi lobulus, menembus dinding hepatosit dan mengalir ke sinusoid-sinusoid. Sinusoid-sinusoid ini akan berjalan secara radier dan berkumpul di tengah lobulus untuk

membentuk vena sentralis. Vena sentralis kemudian berjalan sepanjang lobules hepar menyatu membentuk vena hepatika yang mengalirkan darah dari hepar menuju organ yang berada di luar hepar (Sherwood, 2009; Snell, 2006).



Gambar 2.1: Anatomi Hepar
(Sumber: Treuting, *et al.*, 2018)

2.2.2 Fisiologi Hepar

Hepar merupakan salah satu organ tubuh yang penting dalam pertahanan tubuh baik berupa perlindungan, detoksifikasi maupun metabolisme. Organ hepar juga sebagai jalur utama proses sintesis, metabolisme dan ekskresi bahan-bahan kimia yang masuk ke dalam tubuh. Apabila terjadi kerusakan pada hepar dapat menyebabkan terganggunya metabolisme di dalam tubuh, sehingga terjadilah gangguan homeostasis (Klaassen, 2008).

Berikut fungsi hepar diantaranya yaitu:

- a. Hepar berfungsi dalam metabolisme tiga kategori utama nutrien seperti karbohidrat, protein dan lemak, ketika setelah zat-zat tersebut diserap oleh saluran cerna (Sherwood, 2009).

- b. Hepar berfungsi dalam detoksifikasi yang dilakukan oleh enzim hepar melalui oksidasi, reduksi, hidrolisis ataupun konjugasi zat yang secara fisiologis tidak aktif. Fungsi perlindungan hepar dilakukan oleh sel kupfer yang terdapat di dinding sinusoid hepar. Sel kupfer berfungsi sebagai fagositosis yang ada di dalam vena porta sebelum darah melalui seluruh sinusoid (Surya, 2009).
- c. Hepar memiliki fungsi sebagai sintesis, yaitu penyusunan suatu senyawa dari zat atau molekul yang sederhana menjadi kompleks. Fungsi sintesis hepar antara lain penyusunan protein dan lipoprotein plasma (Surya, 2009).
- d. Hepar terlibat dalam metabolisme zat-zat xenobiotik (senyawa asing bagi tubuh seperti obat-obatan, senyawa karsinogen kimia, insektisida) dalam tubuh. Senyawa ini mengalami metabolisme di hepar melalui hidroksilasi yang dikatalisis sitokrom P450 sehingga menjadi metabolit reaktif. Zat yang dihidroksilasi ini selanjutnya mengalami konjugasi menjadi metabolit polar non toksik (Murray, *et al.*, 2003).

2.2 Fibrosis Hepar

Fibrosis hepar merupakan respon terhadap penyakit hepar kronis yang ditandai oleh aktivasi *Hepatic Stellate Cells* (HSC) serta produksi berlebih protein *extracellular matrix* (ECM), sehingga berdampak pada perubahan struktur jaringan hepar serta disfungsi sel hepar (Rockey, 2006). Penyebab umum dari fibrosis hepar diantaranya yaitu penyalahgunaan alkohol, virus

(HBV dan HCV), obesitas, autoimun hepatitis, gangguan metabolisme, penyakit empedu, akibat paparan toksik yang terjadi terus menerus seta obat-obatan lainnya yang dapat menginduksi penyakit hepar kronik (Mormone, *et al.*, 2011).

Patogenesis fibrosis hepar merupakan proses yang sangat kompleks, melibatkan HSC sebagai sel utama, sel kupffer, leukosit, berbagai mediator, sitokin, growth factors dan inhibitor, serta berbagai jenis kolagen. Patogenesis fibrosis hepar yang dimulai dengan aktivasi HSC (*hepatic stellate cell*) yang meliputi 3 fase yaitu inisiasi, pengekalan dan resolusi hingga terjadi akumulasi jaringan ikat (Friedman, *et al.*, 2007).

Fibrosis hepar berkaitan dengan gangguan utama pada kuantitas dan komposisi ECM. Pada tahap lanjut, hepar dapat mengandung 6 kali lebih banyak ECM daripada hepar yang normal, termasuk kolagen, fibronectin, undulin, elastin, laminin, hyaluronan dan proteoglikan. Akumulasi ECM terjadi akibat peningkatan sintesis dan pengurangan degradasi. Penurunan aktivitas *matrix of metalloproteinase* (MMP) dalam menghilangkan ECM terutama akibat inhibitor spesifik MMP yang berlebihan. *Hepatic stellate cells* (HSC) merupakan sel penghasil ECM utama pada hepar yang cedera. Apabila mengalami cedera kronis, HSC akan teraktivasi menjadi sel seperti miofibroblas, kemudian bermigrasi dan berakumulasi pada lokasi perbaikan jaringan, mensekresi sejumlah besar ECM dan meregulasi degradasi ECM (Friedman, *et al.*, 2007; Wallace, *et al.*, 2008).

Hepatosit merupakan target untuk kebanyakan agen yang hepatotoksik, seperti metabolit alkohol, hepatitis virus maupun asam empedu. Hepatosit yang rusak akan melepaskan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) dan mediator fibrogenik dan menginduksi perekrutan sel darah putih oleh sel inflamasi. Apoptosis dari sel hepatosit yang rusak akan menstimulasi aktivitas fibrogenik dari miofibroblas hepar. Kemudian sel inflamasi akan mengaktivasi HSC untuk mensekresikan kolagen. HSC teraktivasi mensekresikan kemokin inflamasi, mengekspresikan molekul adhesi sel dan memodulasi aktivasi limfosit sehingga sel inflamasi dan fibrogenik menstimulasi satu sama lain. Akhirnya perubahan komposisi ECM dapat secara langsung menstimulasi fibrogenesis (Anom dan Wibawa, 2010).

2.3 Senyawa *Carbon Tetrachloride* (CCl_4)

Senyawa *carbon tetrachloride* (CCl_4) secara luas digunakan sebagai pelarut bahan organik seperti minyak, bahan mentah halo-fluorokarbon untuk pendingin, sebagai bahan pemadam api, dan sebagai bahan anastesi. Akibat banyaknya kasus keracunan akut yang disebabkan penggunaan CCl_4 (Panjaitan, 2008). Karbon tetraklorida (CCl_4) merupakan senyawa tetrahedral yang terbukti hepatotoksik dan dapat menimbulkan kerusakan pada sel-sel hepar. CCl_4 dimetabolisme oleh sitokrom P450 menjadi triklorometil (CCl_3^\cdot) di dalam retikulum endoplasmik hepar. Triklorometil dengan oksigen akan membentuk triklorometil peroksil (CCl_3O_2) yang menyerang lipid membran retikulum endoplasma dengan kecepatan melebihi radikal bebas triklorometil.

Selanjutnya CCl_3O_2 menyebabkan peroksidasi lipid sehingga dapat mengganggu homeostasis Ca^{2+} dan menyebabkan kematian sel (Shanmugasundaram and Venkataram, 2006). CCl_4 dapat menimbulkan stress oksidatif pada hepar, dikarenakan dapat menjadi radikal triklorometil (CCl_3^\cdot) (Weber, *et al.*, 2003), sehingga dapat dikatakan sebagai representatif zat racun yang dapat menyebabkan terjadinya perlemakan hepar (steatosis), fibrosis hepar hingga sirosis hepar (Klaassen, 2008).

Kerusakan sel hepar juga dapat mempengaruhi kadar dari enzim-enzim hati, bilirubin, dan protein di dalam serum. Berdasarkan dari penelitian sebelumnya melaporkan bahwa CCl_4 akan meningkatkan kadar bilirubin total, enzim ALT, AST, serta *Alkaline phosphatase* (ALP) dan sebaliknya menurunkan kadar protein total dalam serum (Shanmugasundaram and Venkataram, 2006).

2.4 Patomekanisme Fibrosis Hepar oleh Senyawa CCl_4

Carbon tetrachloride (CCl_4) dimetabolisme oleh sitokrom P450 menjadi radikal bebas triklorometil (CCl_3^\cdot) di endoplasmik retikulum hepar,. Triklorometil dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoksi ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$) yang dapat menyerang lipid dari retikulum endoplasmik. Peroksidase lipid ini menyebabkan kerusakan struktur dan gangguan fungsi membran sel (Panjaitan, dkk, 2007). Triklorometilperoksi lebih aktif melepaskan hidrogen dari asam lemak rantai panjang tak jenuh (PUFAs) yang menyebabkan peroksidasi lipid mengalami kerusakan pada membran lipid dan

protein serta menyebabkan pula pada penurunan antioksidan (Gutteridge *and* Halliwell, 2007).

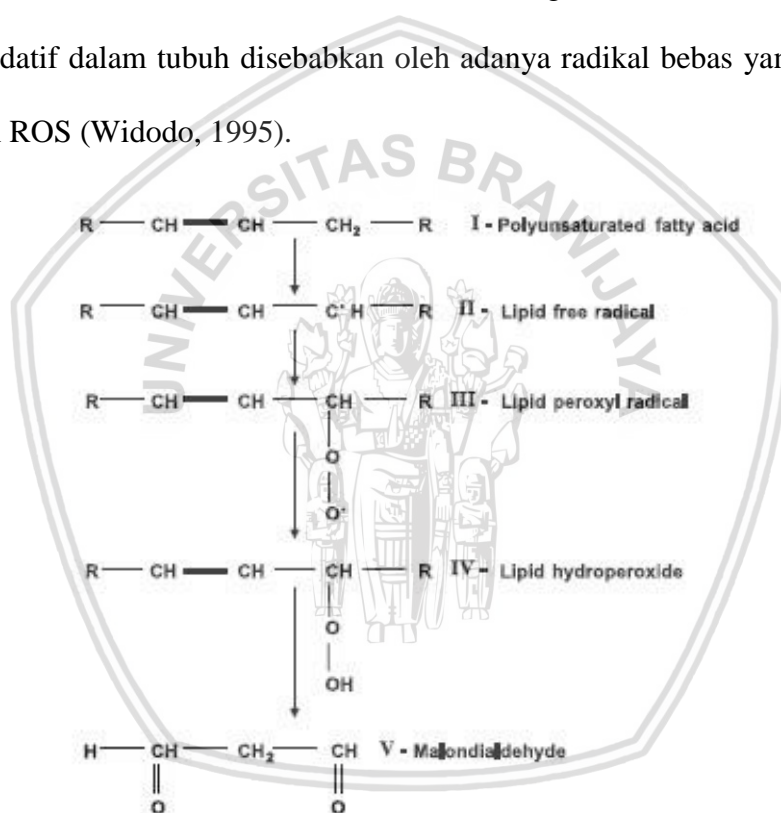
Jumlah PUFAs dalam fosfolipid membran retikulum endoplasma akan berkurang sebanding dengan jumlah CCl₄ yang diinduksikan. Pemberian CCl₄ dalam dosis tinggi dapat merusak retikulum endoplasma, mengakumulasi lipid, mengurangi sintesis protein, mengganggu proses oksidasi, menyebabkan pembengkakan hepar sehingga berat hepar menjadi bertambah, dan bila pemberian jangka panjang dapat menyebabkan nekrosis sentrilobular serta degenerasi lemak di hepar (Jeon, *et al.*, 2003).

Pemberian CCl₄ dapat merangsang peningkatan aktivitas MDA di hepar, akibat adanya peningkatan stres oksidatif yang berdampak negatif pada beberapa komponen penyusun membran sel, yaitu kerusakan pada lipid membran sehingga membentuk malonaldehida (MDA) (Kevin, *et al.*, 2006). Selain itu stress oksidatif juga mengakibatkan peroksidasi lipid memicu perubahan struktur dari membran sel hepatosit, menonaktifkan ikatan membran yang dapat mengganggu fungsi normal sel. Ketika sel hepatosit dirusak oleh radikal bebas, ALP (*Alkaline phosphatase*) akan dilepas menuju sirkulasi tubuh sehingga menyebabkan kenaikan aktivitas ALP dalam serum (Jeremy, 2009).

2.5 Malonaldialdehida (MDA)

Malondialdehida (MDA) merupakan penanda pengukuran peroksidasi lipid yang paling banyak diteliti, sebagai suatu senyawa dialdehida yang merupakan hasil dari pemecahan lipid peroksida dan salah satu penanda adanya

stres oksidatif. Lipid peroksida adalah hasil reaksi oksidasi radikal bebas dengan lipid membran sel jaringan tubuh atau dengan asam lemak tak jenuh (PUFAs) (Suwandi, 2012). Hasil akhir dari reaksi ini akan membentuk hidrogen peroksida, yang berdampak pada kerusakan membran sel antara lain dengan mengubah struktur dan fungsi membran, dalam kondisi yang lebih ekstrem menimbulkan kematian sel (Gutteridge *and* Halliwell, 2007). Stres oksidatif dalam tubuh disebabkan oleh adanya radikal bebas yang dihasilkan oleh ROS (Widodo, 1995).



Gambar 2.2: Skema Pembentukan MDA dari *Polyunsaturated fatty acid* (Groto, *et al.*, 2009).

2.6 Alkaline Phosphatase (ALP)

Alkaline phosphatase (ALP) merupakan enzim yang menghidrolisis ester monofosfat pada pH alkaline phosphatase dengan menghasilkan fosfat organik. Enzim ini terdapat banyak dalam jaringan, terutama pada jaringan organ

hepar, tulang, mukosa serta plasenta (Kirsch, 2001). Fungsi fisiologis ALP yang sebagian besar di jaringan hanya sedikit diketahui, kecuali isoenzim tulang yang memiliki peran dalam mineralisasi kerangka normal (Gianni, *et al.*, 2005). Tidak hanya kadar SGPT dan SGOT serum saja yang meningkat pada hampir semua penyakit hepar, melainkan juga pada kadar ALP. ALP terikat pada membrane kanakuli hepar. Enzim ini sensitif untuk mendeteksi adanya obstruksi pada saluran empedu. Peningkatan ALP serum biasanya disebabkan sintesis oleh sintesis hepar yang meningkat sebagai respon terhadap adanya obstruksi biliaris. Apabila ALP meningkat sampai kadar yang tinggi, maka hal tersebut sering berhubungan dengan nekrosis hepar yang luas, seperti cedera hepar akibat toksin, hepatitis virus berat, atau kolaps sirkulasi yang berkepanjangan (Martin, *et al.*, 2004; Surya, 2009).

Ketika sel hepar mengalami kerusakan, *Alkaline phosphatase* tersebut akan dilepaskan dari jaringan tersebut ke dalam darah, sehingga dapat diukur kadarnya. Hal ini disebabkan akibat adanya kerusakan pada struktur dan fungsi membran sel hepar (Haki, 2009). Selain membran sel hepar, apabila saluran empedu ataupun sistem empedu tidak bekerja dengan benar maka akan terjadi suatu kerusakan enzim-enzim sel hepar seperti ALP yang akan dilepaskan ke dalam darah sehingga akan terjadi peningkatan pada kadarnya (Jeremy, 2009).

2.7 Kadar SGPT dan SGOT Tikus (*Rattus norvegicus*)

SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) atau disebut sebagai *Alanine Aminotransferase* (ALT) merupakan enzim yang terdapat dalam sel

hepar (hepatosit), yang bersifat sangat spesifik untuk indikator penyakit hepar dibandingkan dengan enzim yang lain. Deteksi SGPT dalam serum juga menjadi petunjuk adanya kerusakan hepar yang kuat. SGOT (*Serum Glutamic Oxaloasetic Transaminase*) atau disebut juga *Aspartat Aminotransaminase* (AST) adalah enzim yang banyak terdapat di jantung dibandingkan hati. Walaupun jumlahnya di hepar sedikit, namun SGOT juga akan meningkat di hampir semua penyakit hepar, terutama pada keadaan nekrosis akibat virus atau toksin. Pada kerusakan hepar akut, peningkatan SGPT lebih besar daripada SGOT sehingga SGPT dapat dikatakan sebagai indikator untuk mengetahui kerusakan sel hepar. Kadar SGPT juga lebih sensitif dan spesifik daripada kadar SGOT dalam mendeteksi penyakit hepar (Giboney, 2005; Gaze, 2007; Surya, 2009).

Serum transaminase adalah indikator yang peka pada kerusakan sel-sel hepar. Kadar SGPT normal pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar adalah 17,5-30,2 U/L, sedangkan kadar SGOT normalnya yaitu 45,7-80,8 U/L. Kenaikan kadar transaminase serum disebabkan oleh sel-sel yang kaya akan transaminase mengalami nekrosis atau hancur sehingga enzim-enzim tersebut masuk ke dalam peredaran darah (Hartono, dkk., 2005).

2.8 Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.)

Kedelai hitam yang berada di Indonesia berpusat di Jawa, Lampung, Nusa Tenggara Barat, dan Bali (Nurahman, 2015). Kedelai hitam merupakan salah satu varietas dari kedelai (*Glycine* (L.) max). Kandungan dari kedelai

hitam diantaranya isoflavon, asam amino esensial, vitamin E serta anthosianin dan sumber serat yang baik (Anderson, *et al.*, 2009).



Gambar 2.3: Kedelai Hitam

(Sumber: Warisno, dkk, 2010)

Menurut Kikimana dan Tumarsin (1996), taksonomi kedelai adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub-divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Polypetales</i>
Famili	: <i>Leguminosae (Papilionaceae)</i>
Sub-famili	: <i>Papilionoideae</i>
Genus	: <i>Glycine</i>

Pertimbangan lain dari pemanfaatan kedelai hitam sebagai bahan baku pangan fungsional yaitu karena di Indonesia kurang teroptimalkan pemanfaatannya seperti kedelai kuning. Selama ini, pemanfaatan kedelai hitam terutama di Indonesia hanya sebatas sebagai bahan baku pembuatan kecap. Padahal kedelai hitam mempunyai kandungan fenolik, tanin, antosianin dan

isoflavon dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibanding kedelai kuning. Kandungan flavonoid dari kedelai hitam 6 kali lebih banyak dibandingkan kedelai kuning (0,41 mg kandungan total flavonoid kedelai kuning dan 2,57 mg pada kedelai hitam) (Nurrahman, 2015). Diantara keempat bentuk isoflavon pada kedelai hitam, aktivitas antioksidatif tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon, terutama genistein (Purwoko, 2004). Kandungan genistein kedelai hitam dengan kadar $0,65 \pm 0,07$ mg/g yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar genistein kedelai kuning yaitu $0,40 \pm 0,01$ mg/g (Nurrahman, 2015).

2.9 Bahan Aktif Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus*

Tempe adalah makanan hasil fermentasi yang dibuat dari kedelai diinokulasi dengan jamur *Rhizopus oligosporus* dalam fermentasi padat. Tempe memiliki ciri - ciri berwarna putih, tekstur yang kompak dan flavor spesifik. Warna putih disebabkan adanya miselia jamur yang tumbuh pada permukaan biji kedelai. Tekstur yang kompak juga disebabkan oleh miselia - miselia jamur yang menghubungkan antara biji - biji kedelai tersebut. Terjadinya degradasi komponen-komponen dalam kedelai dapat menyebabkan terbentuknya flavor spesifik setelah fermentasi (Kustyawati, 2009).

Tempe mengandung berbagai nutrisi yang diperlukan oleh tubuh seperti protein, lemak, karbohidrat, dan mineral. Kandungan protein yang terdapat dalam tempe lebih tinggi dibandingkan dengan produk olahan kedelai yang

lain. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa zat gizi tempe seperti protein dan karbohidrat, lebih mudah dicerna, diserap dan dimanfaatkan oleh tubuh. Hal ini dikarenakan jamur *Rhizopus sp.* yang tumbuh pada kedelai menghidrolisis senyawa - senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana yang mudah dicerna oleh manusia (Kasmidjo, 1990).

Proses pengolahan tempe pada umumnya meliputi tahap penyortiran, pencucian, perendaman bahan mentah, perebusan, pengulitan, penirisan dan pendinginan, inokulasi, pengemasan, kemudian fermentasi. Proses penyortiran bertujuan untuk memperoleh produk tempe yang berkualitas, yaitu memilih biji kedelai yang bagus dan padat berisi. Biasanya di dalam biji kedelai tercampur kotoran seperti pasir atau biji yang keriput dan keropos. Pencucian bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang melekat maupun tercampur di antara biji kedelai. Proses perendaman yaitu kedelai direndam dalam air agar kulit tipis pada kedelai lepas lebih mudah sehingga jamur dapat memfermentasi kedelai tanpa kulit. Kemudian proses perebusan yang bertujuan untuk melunakkan biji kedelai dan memudahkan dalam pengupasan kulit serta bertujuan untuk mengurangi bau langu dari kedelai. Perebusan dilakukan selama 30 menit atau ditandai dengan mudah terkelupasnya kulit kedelai. Penirisan dan pendinginan bertujuan mengurangi kadar air dalam biji dan menurunkan suhu biji sampai sesuai dengan kondisi pertumbuhan jamur (Mayangsari, 2010).

Proses fermentasi yang terjadi pada tempe berfungsi untuk mengubah senyawa makromolekul kompleks pada kedelai (seperti protein, lemak, dan karbohidrat) menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti peptida, asam

amino, asam lemak dan monosakarida. Pada tahap tersebut, proses hidrolisis isoflavon glikosida berlangsung menjadi isoflavon aglikon. Isoflavon aglikon dihasilkan dari aktivitas enzim *β -glukosidase* mikroba yang hidup di sekitar kedelai (Purwoko, 2004). Ketika proses fermentasi, enzim *β -glukosidase* mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosida di gugus *alkyl* dan *aryl β -D-glucosides* serta glikosida yang hanya mengandung residu karbohidrat (Vattern dan Shetty, 2003). Selain itu, produk tempe dari kedelai juga merupakan sumber utama *bioactive peptides* yang dapat sebagai anti-hipertensi, immunomodulator, anti-hipersensitif, dan aktifitas antioksidan. Proses protein kedelai menjadi peptida terjadi di dalam saluran GI (*gastrointestinal*) dengan memaparkan sisi aktifnya di dalam rantai asam amino (Korhonen and Pilanto, 2006).

Enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri *Rhizopus oligosporus* yang terdapat dalam ragi tempe dapat mengubah senyawa flavanon menjadi isoflavon selama proses fermentasi. Senyawa isoflavon merupakan salah satu komponen yang juga mengalami metabolisme. Senyawa isoflavon pada kedelai berbentuk senyawa konjugat dengan senyawa gula melalui ikatan glikosidik. Selama proses fermentasi, ikatan glikosidik terhidrolisa, sehingga dibebaskan senyawa gula dan isoflavon aglikon yang bebas. Senyawa isoflavon aglikon ini dapat mengalami transformasi lebih lanjut membentuk senyawa transforman baru. Hasil transformasi lebih lanjut dari senyawa aglikon ini justru menghasilkan senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas biologi lebih tinggi (Ralston, 2005).

Kedelai yang diolah menjadi tempe dan kemudian diproses menjadi sari memiliki kandungan genistein, yang merupakan suatu anti oksidan flavonoid yang paling tinggi di banding produk olahan lainnya. Antioksidan flavonoid ini berfungsi sebagai anti tumor atau anti kanker (Atun, 2009). Sari tempe juga mengandung enzim fibrinolitik protease yang berdasarkan penelitian Nurhidajah (2010) ditunjukkan besar diameter zona bening yang berkisar antara 0,9-4,8 mm. Enzim fibrinolitik protease merupakan salah satu jenis enzim protease yang digolongkan sebagai salah satu jenis protease serin yang dikenal memiliki kemampuan untuk mendegradasi benang-benang fibrin (Sugimoto *et al*, 2007). Selain itu sari tempe kedelai hitam memiliki kandungan air 61,81%, protein 20,36%, lemak 2,9% dan abu 0,97% (Nurhidajah, 2010).

Fibrosis hepar menyebabkan penurunan pada fungsi hepar serta rusaknya arsitektur dari hepar. Genistein merupakan salah satu senyawa isoflavon yang membantu menangkal radikal bebas penyebab dari fibrosis hepar (Ralston, 2005). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Poernomo (2015) secara *in vitro* bahwa kedelai hitam yang difermentasikan dengan *Rhizopus oligosporus* mampu menghasilkan enzim fibrinolitik sehingga dapat berpotensi untuk mendegradasi benang-benang fibrin dari hepar yang mengalami fibrosis.

2.10 Hewan Coba Tikus (*Rattus novergicus*)

Hewan percobaan biasanya digunakan sebagai media dalam penelitian untuk mempelajari serta mengembangkan ilmu pengetahuan. Tikus merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena dalam pemeliharaanya

yang mudah, serta secara garis besar fungsi, bentuk organ dan proses biokimianya antar tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) ini memiliki ciri rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh 440 mm, panjang ekor 205 mm dengan bobot pada usia dewasa adalah sekitar 250-500 gram (Suckow, *et al.*, 2006).

Berikut klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut Armitage (2004), adalah sebagai berikut:






Kingdom	: <i>Animalia</i>
Kelas	: <i>Mamalia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Famili	: <i>Muridae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Pengembangan hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) pada kerusakan hepar seperti fibrosis menggunakan CCl₄ dengan metode menurut Costandinou, *et al.*, (2005) yaitu diinduksi CCl₄ konsentrasi 20% yang diencerkan dengan *olive oil*, dengan dosis 0,2 mL/100g BB sebanyak dua kali selama dua minggu pertama. Empat minggu berikutnya, diinduksi CCl₄ 25% dosis 0,2 mL/100g BB pada hewan coba sebanyak dua kali dalam seminggu.

3.1 KERANGKA KONSEPTUAL



Keterangan:

-  = Pengaruh induksi CCl₄
-  = Pengaruh sari tempe kedelai hitam
-  = Penghambatan oleh sari tempe kedelai hitam
-  = Perlakuan
-  = Parameter yang diamati

Senyawa CCl₄ yang telah diinduksikan pada hewan coba dapat menimbulkan kerusakan hepar. CCl₄ dimetabolisme oleh sitokrom P450 di dalam retikulum endoplasma menjadi triklorometilperoxide (CCl₃O₂⁻) yang menjadi sumber radikal bebas di dalam hepar. Pemberian CCl₄ dapat merangsang peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*). Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan sehingga menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (PUFAs) penyusun membran sel untuk mencapai keseimbangan atau disebut sebagai proses peroksidasi lipid yang menghasilkan produk aldehida berupa MDA (*Malondialdehida*). MDA digunakan sebagai indikator kerusakan oksidatif dan produk akhir dari peroksidasi lipid yang dapat dihasilkan melalui oksidasi oleh radikal bebas. Tingginya radikal bebas dalam sirkulasi dapat mengakibatkan peningkatan aktivitas MDA di hepar.

Stress oksidatif akan mengakibatkan peroksidasi lipid memicu perubahan struktur dari membran sel hepatosit, menonaktifkan ikatan membran dengan reseptor ataupun enzim yang dapat mengganggu fungsi normal sel. Ketika sel

hepatosit dirusak oleh radikal bebas, ALP (*Alkaline phosphatase*) akan dilepas menuju sirkulasi tubuh sehingga menyebabkan kenaikan aktivitas ALP dalam serum. Selain itu stress oksidatif juga dapat mengaktifkan sel inflamasi, sehingga terjadi pelepasan mediator inflamasi. Produksi yang berlebihan dari mediator inflamasi dapat menyebabkan kerusakan dari struktur dan membran sel hepar, sehingga dapat mempengaruhi aktivasi sel stela hepatosit yang dapat memicu akumulasi ekstraseluler matriks serta pembentukan jaringan ikat.

Pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi dari *Rhizopus oligosporus* yang digunakan sebagai terapi fibrosis hepar memiliki kandungan antioksidan berupa isoflavon. Senyawa isoflavon dapat mengeliminasi radikal bebas dan mencegah reaksi berantai lebih lanjut terhadap komponen membran sel sehingga dapat mengurangi pembentukan MDA sebagai produk akhir sekaligus juga dapat menurunkan kadar MDA. Penurunan dari kadar MDA tersebut dapat memperbaiki akibat dari kerusakan pada membran sel hepatosit yang berpengaruh pada kadar ALP dalam serum yang dilepaskan ke sirkulasi tubuh sehingga menjadi menurun.

Selain sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi dari *Rhizopus oligosporus* memiliki kandungan isoflavon juga mengandung enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik ini banyak ditemukan pada makanan yang terfermentasi baik oleh mikroba. Enzim fibrinolitik memiliki kemampuan untuk mendegradasi ekstraseluler matrik berlebih yang menyebabkan fibrosis pada hepar. Sehingga produksi yang berlebihan dari mediator inflamasi yang menyebabkan kerusakan struktur dan membran sel hepar menjadi terhambat. Oleh sebab itu

ekstraseluler matriks pada hepar tersebut dapat terdegradasi dengan enzim fibrinolitik.

3.2 Hipotesis Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dapat menurunkan kadar MDA (*Malondialdehida*) tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄.
2. Pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dapat menurunkan kadar ALP (*Alkaline phosphatase*) tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April hingga Juni 2017. Pelaksanaan penelitian terdiri atas tahapan pembuatan tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* sampai dengan pembuatan sari yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya. Tahapan *freeze drying* dan uji cakram fibrin dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga. Tahapan pengujian LC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, Fakultas Teknik, Politeknik Negeri Malang. Tahapan perawatan, perlakuan dan pembedahan hewan coba yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pengukuran kadar MDA dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengukuran kadar serum ALP dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator, tabung falcon, sentrifugator, *vortex mixer*, panci, cawan petri, blender, kertas saring, *freeze dryer*, refrigerator, timbangan, *sputit*, tabung *venoject*, mortie, gelas ukur,

pipet, *disposable syringe*, kandang tikus, *dissecting set*, vacutainer, *microtube*, spektrofotometer UV-Vis.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*), *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010, NaCl 0,9%, aquadest, CCl₄, *olive oil*, *fibrin bovine blood*, dapar phospat pH 7,8, agarosa, asetonitril, ammonia format, *phospat buffer saline*, standar MDA, TCA 100%, HCl, Na-Thio 1%, reagen kit ALP (Dyasis®).

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar umur 2 bulan dengan berat 150-200 gram (Costandinou *et al.*, 2005). Tikus putih diaklimatisasi terhadap lingkungan baru selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasar rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t: jumlah kelompok perlakuan

n: jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan *post-test control design only*. Rancangan penelitian ditunjukkan Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian dengan 5 kelompok perlakuan:

Kelompok	Keterangan Perlakuan
Kelompok negatif	Tikus tidak diberikan sari tempe kedelai hitam (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) hasil fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i> dan tidak induksi CCl ₄ .
Kelompok positif	Tikus diinduksi CCl ₄ 20% secara intraperitoneal dengan volume 0,2 mL/100gBB tiap dua kali perminggu selama dua minggu, kemudian diinduksi CCl ₄ 25% secara intraperitoneal volume 0,2 mL/100gBB tiap dua kali perminggu selama empat minggu berikutnya untuk pembuatan hewan model fibrosis hepar
Kelompok terapi 1	Tikus model fibrosis hepar dengan terapi sari tempe kedelai hitam masing-masing sebanyak 200 mg/kgBB

	diberikan secara per-oral sebanyak 2 mL setiap hari satu kali selama 14 hari
Kelompok terapi 2	Tikus model fibrosis hepar dengan terapi sari tempe kedelai hitam masing-masing sebanyak 400 mg/kgBB diberikan secara per-oral sebanyak 2 mL setiap hari satu kali selama 14 hari
Kelompok terapi 3	Tikus fibrosis hepar dengan terapi sari tempe kedelai hitam masing-masing sebanyak 800 mg/kgBB selama diberikan secara per-oral sebanyak 2 mL setiap hari satu kali selama 14 hari

4.3.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- Variabel bebas : Dosis sari tempe biji kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dan dosis induksi CCl₄.
- Variabel tergantung : Kadar MDA dan ALP
- Variabel kendali : Tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, pakan dan kondisi pemeliharaan.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba pada semua kelompok perlakuan dikandangkan secara terpisah dan diadaptasikan selama lebih kurang 7 hari. Selama penelitian tikus diberikan pakan dan minum secara *ad libitum*.

4.4.2 Pembuatan Hewan Model Fibrosis Hepar

Induksi fibrosis hepar dilakukan dengan pemberian CCl₄ konsentrasi 20% yang diencerkan dengan *virgin olive oil*, dengan dosis 0,2 mL/100g BB sebanyak dua kali seminggu selama dua minggu pertama. Empat minggu berikutnya, dilakukan induksi CCl₄ 25% menggunakan dosis 0,2 mL/100g BB pada hewan coba sebanyak dua kali dalam seminggu (Costandinou, *et al.*, 2005). Sediaan CCl₄ dibuat berdasarkan pengenceran yang diberikan dan sediaan tersebut disimpan pada suhu ruang. Induksi CCl₄ dilakukan secara intraperitoneal serta perhitungan pengenceran CCl₄ dan *olive oil* dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

4.4.3 Penyiapan Inokulum

Pembuatan suspensi spora *Rhizopus oligosporus* dilakukan dengan cara menambahkan 10 mL NaCl 0,9% steril ke dalam tabung inokulum yang telah diinkubasi selama 72 jam, kemudian divortex \pm 15 menit sampai spora jamur terlepas dari medianya (Poernomo, dkk., 2015).

4.4.4 Pembuatan Media Biji Kedelai Hitam

Biji kedelai hitam menggunakan kualitas Detam-1 menurut pemilihan kualitas detamnya berdasarkan standart yang terdapat di BALITKABI (Balai

Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi). Sebanyak 500 gram masing-masing biji kedelai hitam dicuci dengan aquadest, kemudian direbus selama 15 menit. Setelah dicuci, dilakukan pengelupasan pada kulitnya dan kemudian direndam dalam aquadest (1:3, b/v) selama 24 jam. Setelah perendaman 24 jam, dicuci dan direbus kembali dengan aquadest (1:4, b/v) selama 15 menit dan ditiriskan selama 30 menit (Poernomo, dkk., 2015). Keterangan varietas kedelai hitam dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi terdapat pada **Lampiran 3**.

4.4.5 Proses Fermentasi Tempe

Fermentasi biji kedelai hitam oleh *Rhizopus oligosporus* dilakukan di dalam cawan petri steril. Tiap cawan berisi 100 gram biji dan difermentasi dengan 10 mL suspensi spora dan dicampur sampai homogen. Kemudian seluruh cawan petri dimasukkan inkubator pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 43 jam (Poernomo, dkk., 2015).

4.4.6 Pembuatan Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.)

Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus*

Pembuatan sari dilakukan dengan menghaluskan sebanyak 500 g tempe kedelai hitam di-*blender* dengan 1 L larutan aquadest untuk menghasilkan bubur encer. Bubur encer selanjutnya disaring menggunakan kertas saring hingga diperoleh ampas dan filtrat berupa sari tempe. Filtrat dikeringkan dengan proses *freeze drying* pada suhu -15° (Poernomo, dkk., 2015).

4.4.7 Uji Cakram Fibrin

Fibrin bovine blood sebanyak 0,3% dalam 100 mL dapar borat pH 7,8 dicampur dengan agarosa sebanyak 1,7%, kemudian dipanaskan. Kemudian dituang media *fibrin plate* sebanyak 20 mL ke dalam cawan petri. *Methylen blue* ditambahkan sebanyak 400 μ L pada plate agar zona jernih fibrinolitik terlihat dengan jelas. Setelah beberapa menit media akan memadat, dibuat lima lubang dan diinokulasikan sari tempe sebanyak 60 μ L. Seluruh cawan diinkubasi pada suhu 37° C selama 20 jam dan aktivitas fibrinolitik dapat diukur. Zona jernih transparan mengindikasikan hasil degradasi fibrin dan diameter zona sebanding dengan potensi aktivitas fibrinolitik (Poernomo, dkk., 2015).

4.4.8 Identifikasi Profil Antioksidan

Uji LC-MS dengan hasil saringan tempe kedelai hitam sebanyak 100 μ l ditambah dengan larutan asetonitril hingga 1000 μ l kemudian ditambah dengan larutan ammonia format 20 mMol sebanyak 500 μ l. Tahap selanjutnya adalah filtrisasi dan dimasukkan ke dalam botol vial. Sampel di injeksikan ke dalam alat LC-MS yang terdiri dari fase gerak larutan A (0,1% asam format dalam H₂O) dan larutan B (0,1% asam format dalam asetonitril), dan fase diam atau kolom Hypersilgold. Laju alir fase gerak 300 μ l/min (Firmansyah, dkk., 2015).

4.4.9 Pemeriksaan SGOT-SGPT Untuk Penentuan Fibrosis Hepar

Pemeriksaan keberhasilan pembuatan hewan model fibrosis hepar dengan induksi CCl₄ dilakukan dengan mengukur kadar SGPT dan SGOT secara berkala selama masa induksi 6 minggu. Pemeriksaan dilakukan pada kelompok kontrol positif pada waktu sebelum induksi CCl₄, setelah induksi CCl₄ 20% selama 2 minggu, setelah induksi CCl₄ 25% selama 2 minggu pertama, dan setelah induksi CCl₄ 25% selama 2 minggu kedua.

Penetapan aktivitas SGOT dan SGPT diawali dengan pengambilan darah melalui *sinus orbitalis* mata, didiamkan selama 30 menit kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit hingga didapatkan serum. Setelah itu dibaca aktivitas SGOT dan SGPT menggunakan alat spektrofotometer (*Shimadzu UV-1201 V*). Aktivitas SGOT dan SGPT ditetapkan berdasarkan reaksi enzimatik. Serum dicampur dengan *reagent kit* dengan temperatur 25°/30°. Serum diambil sebanyak 200 mikroliter dan *reagent kit* sebanyak 1000 mikroliter. Setelah homogen dibaca absorbansinya pada menit 1, 2, dan 3 menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 334 nm (Pertiwi dan Widyaningsih, 2005).

4.4.10 Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.)

Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* sebagai Terapi

Pemberian terapi sari tempe kedelai hitam diberikan secara peroral, setelah penginduksian CCl₄ yang dilakukan dalam kurun waktu 6 minggu. Pemberian terapi sari masing-masing pada T1 sebesar 200 mg/kgBB selama 2 minggu, T2 sebesar 400 mg/kgBB selama 2 minggu dan T3 sebesar 800 mg/kgBB selama 2 minggu (Yusof, *et al.*, 2013). Pemberian sari tempe untuk

per tikus yaitu sebanyak 2 mL dengan perhitungan dosis dan pengenceran sari yang dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

4.4.11 Pengambilan Sampel Serum Darah

Euthanasi tikus dilakukan dengan dislokasi pada bagian leher, kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diposisikan pada posisi rebah dorsal kemudian dilakukan nekropsi. Insisi dilakukan diposisi ventral midline abdomen, kemudian insisi kulit dan subkutan ke arah kranial lalu insisi musculus daerah abdomen ke arah kranial. Prosesus xiphoideus diangkat kemudian dipotong beserta sternum hingga cavum thoraks terbuka. Sampel darah diambil dengan menusukkan spuit 3 mL ke atrium kiri jantung. Darah dimasukkan kedalam vacutainer *red stopper* dan diposisikan miring 45° lalu dibiarkan mengendap pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk mendapatkan serum. Selanjutnya serum dikoleksi dan dimasukkan kedalam tabung *microtube* dan disimpan di lemari pendingin dengan suhu berkisar 2-8 °C.

4.4.12 Pembuatan Kurva Baku *Malondialdehida* (MDA)

Larutan stok kit MDA dengan konsentrasi sebesar 0,25; 0,5; 1; 2 dan 5 µL/mL diambil masing-masing 100 µL dan dimasukkan dalam *microtube* yang berbeda. Larutan ditambah dengan 550 µL aquadest. Larutan tersebut ditambahkan 100 µL TCA 10%, 250 µL HCl 1 N dan 100 µL Na-Thio 1%. Selanjutnya larutan dihomogenkan menggunakan sentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil, lalu diinkubasi dalam penangas air selama 20 menit dalam suhu 100°C dan didinginkan pada suhu ruang. Larutan

standar MDA tersebut diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (532 nm). Hasil absorbansi MDA kemudian dibuat kurva standar MDA (**Lampiran 12**).

4.4.13 Pengukuran Kadar *Malondialdehida* (MDA)

Sebanyak 100 μL serum dimasukkan dalam *eppendorf* baru dan ditambahkan TCA 10% sebanyak 100 μL , Na-Thio 1% sebanyak 100 μL , HCL 1 N sebanyak 250 μL dan 450 μL *aquadest*. Larutan tersebut selanjutnya dihomogenkan dengan cara disentrifugasi 3.000 rpm selama 5 menit. Larutan dipanaskan 100°C selama 20 menit di dalam *water bath* kemudian dibiarkan sebentar dalam suhu ruang. Selanjutnya diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 532 nm. Absorbansi yang diperoleh kemudian diplotkan pada kurva/persamaan regresi linear yang diperoleh sehingga didapatkan kadar MDA (**Lampiran 12**).

4.4.14 Pengukuran Kadar *Alkaline Phosphatase* (ALP)

Pemeriksaan aktivitas ALP diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri. Aktivitas ALP ditetapkan berdasarkan reaksi enzimatik menggunakan reagen kit Dyasis® ALP yang terdiri dari (reagen 1) diethanolamine pH 9,8 sebanyak 1,2 mmol/L dan magnesium chloride 0,6 mmol/L; (reagen 2) p-nitrophenylphosphate 50 mmol/L. Larutan sampel berisi campuran antara reagen 1 dan reagen 2 dengan perbandingan 4:1. Sebanyak 600 μL reagen kit ALP direaksikan dengan 12 μL sampel, selanjutnya divortex dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit. Kemudian sampel dibaca

absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm (Pramushinta, 2008) (**Lampiran 13**).

4.5 Analisa Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kuantitatif berupa persentase kadar MDA dan ALP dianalisa menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dengan *software SPSS 16 for Windows*. Analisa *one-way ANOVA* didahului dengan uji distribusi data, selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data tersebut memiliki varian yang sama atau tidak. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan atau perbedaan secara keseluruhan atau kelompok perlakuan. Apabila hasil uji *one-way ANOVA* menunjukkan hasil yang signifikan, maka dapat dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Tukey* (Beda Nyata Jujur) dengan α 1%.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar Hasil Induksi CCl₄

Pengukuran kadar SGOT-SGPT pada tikus menjadi salah satu keberhasilan induksi CCl₄ pada model fibrosis hepar. Karbon tetrachloride (CCl₄) adalah senyawa model hepatotoksik yang dapat menimbulkan stress oksidatif pada hepar sehingga memicu perubahan struktur dari membran sel hepatosit. Keberhasilan induksi CCl₄ dalam menyebabkan fibrosis hepar dapat diamati melalui aktivitas enzim SGOT-SGPT yang dilakukan sebelum nekropsi pada tikus melalui *sinus orbitalis*. Pengukuran kadar SGOT dan SGPT dilakukan sebelum induksi CCl₄, setelah induksi CCl₄ 20% selama 2 minggu, setelah induksi CCl₄ 25% selama 2 minggu pertama, dan setelah induksi CCl₄ 25% selama 2 minggu kedua. Menurut Ganda (2007) menyatakan bahwa pemberian senyawa hepatotoksik dengan konsentrasi yang lebih tinggi mengakibatkan tingkat kerusakan hepar tikus yang lebih besar.

Berikut dibawah ini hasil pengukuran kadar SGOT dan SGPT pada tikus model fibrosis hepar yang terdapat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rasio kadar SGOT dan SGPT pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar hasil induksi CCl₄.

	Sampel	Hasil SGOT (U/L)	Hasil SGPT (U/L)	Keterangan Hasil	Rasio De Ritis SGOT:SGPT
Sebelum Induksi	K(+) 1	45	22	Normal	-
	K(+) 2	48	21	Normal	-
	K(+) 3	54	28	Normal	-
	K(+) 4	58	30	Normal	-
Induksi Minggu ke-2	K(+) 1	216	167	Meningkat	1,293
	K(+) 2	224	179	Meningkat	1,251
	K(+) 3	257	185	Meningkat	1,389

Induksi Minggu ke-4	K(+) 4	137	114	Meningkat	1,201
	K(+) 1	237	172	Meningkat	1,377
	K(+) 2	161	123	Meningkat	1,308
	K(+) 3	253	169	Meningkat	1,497
	K(+) 4	306	199	Meningkat	1,537
Induksi Minggu ke-6	K(+) 1	304	191	Meningkat	1,591
	K(+) 2	242	158	Meningkat	1,531
	K(+) 3	279	184	Meningkat	1,516
	K(+) 4	262	173	Meningkat	1,514

Hasil kadar SGOT-SGPT sebelum induksi menunjukkan dalam rentang normal yaitu pada kadar SGOT normalnya berkisar 45,7-80,8 U/L dan kadar SGPT normalnya 17,5-30,2 U/L. Pada induksi minggu ke-2 menunjukkan hasil rasio SGOT:SGPT dalam rentang 1,2-1,3. Pada induksi minggu ke-4 menunjukkan peningkatan dengan diperoleh hasil rasio SGOT:SGPT dalam rentang 1,3-1,5. Pada induksi minggu ke-6 mengalami peningkatan kadar SGPT-SGOT dan diperoleh hasil rasio SGOT:SGPT mencapai rata-rata 1,5. Hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa hewan coba telah mengalami fibrosis hepar pada minggu ke-6. Menurut Botros and Sikaris (2013) Penentuan fibrosis hepar pada hewan coba dapat dilakukan dengan menggunakan rasio De Ritis, yaitu dengan membandingkan kadar SGOT:SGPT. Bila hasil perbandingan antara SGOT dan SGPT berjumlah 1,5 maka hewan coba dapat dinyatakan beresiko mengalami fibrosis hepar.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Bahtiar (2017) dosis CCl₄ yang digunakan juga sudah sesuai dan menunjukkan hasil kondisi fibrosis secara histopatologi dengan menggunakan pewarnaan *Masson trichrome* (**Lampiran 18**). Setelah minggu ke-enam dilanjutkan dengan pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus*.

5.2 Pengaruh Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar MDA (*Malondialdehyde*)

Pengukuran kadar *Malondialdehyde* (MDA) serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada setiap kelompok dilakukan dengan metode uji *Thiobarbituric Acid* (TBA) dengan mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 532 nm (**Lampiran 13**). Pengukuran kadar MDA pada serum tikus model fibrosis hepar yang telah diberi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* ditampilkan pada **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Rata-rata kadar *Malondialdehyde* (ng/mL) serum tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-Rata Aktivitas MDA \pm SD (ng/mL)	Rata-Rata Kadar MDA (%)	Rata-Rata Penurunan Kadar MDA Terhadap Kontrol Positif (%)
Kontrol Negatif	0,26 \pm 0,021 ^a	40,6	59,4
Kontrol Positif	0,64 \pm 0,036 ^d	100	-
Kelompok Terapi 1 (200 mg/kgBB)	0,49 \pm 0,029 ^c	76,5	23,5
Kelompok Terapi 2 (400 mg/kgBB)	0,38 \pm 0,046 ^b	59,3	40,7
Kelompok Terapi 3 (800 mg/kgBB)	0,28 \pm 0,031 ^a	43,7	56,3

Keterangan:

- Perbedaan notasi a, b, c, d menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,01$) antar kelompok perlakuan.
- Rata-rata kadar MDA pada kontrol positif dengan catatan dianggap 100%.

Hasil analisa statistik menggunakan *IBM SPSS Statistic 24* menunjukkan bahwa uji normalitas dan homogenitas memiliki hasil data yang terdistribusi normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji *oneway*

ANOVA. Uji *oneway* ANOVA menunjukkan bahwa sari tempe kedelai hitam dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan. Pada hasil uji *post-hoc* Tukey menunjukkan bahwa kelompok perlakuan sari tempe kedelai hitam memiliki perbedaan yang nyata karena memiliki notasi yang berbeda. Data pada **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok kontrol negatif yang merupakan kelompok kontrol tanpa induksi CCl₄ memiliki rata-rata kadar *malondialdehyde* sebesar $0,26 \pm 0,021$ ng/mL. Pada kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kgBB memiliki rata-rata kadar MDA sebesar $0,49 \pm 0,029$ ng/mL, dosis 400 mg/kgBB memiliki rata-rata kadar MDA sebesar $0,38 \pm 0,046$ ng/mL dan dosis 800 mg/kgBB memiliki rata-rata kadar MDA sebesar $0,28 \pm 0,031$ ng/mL lebih rendah dari pada kelompok positif sebesar $0,64 \pm 0,036$ ng/mL. Rata-rata kadar MDA pada kelompok terapi dosis 800 mg/kgBB tidak memiliki perbedaan yang nyata dengan kelompok negatif atau sehat, hal ini dapat diartikan bahwa kelompok terapi 800 mg/kgBB mempunyai respon terhadap radikal bebas yang hampir sama dengan kelompok negatif, sehingga dosis 800 mg/kgBB adalah dosis efektif dalam menurunkan kadar MDA. Secara normal MDA tetap diproduksi oleh sel akibat adanya radikal bebas yang terbentuk ketika metabolisme dalam sel terjadi. Dalam keadaan normal peroksidasi lipid di dalam tubuh yang memicu produksi MDA yang masih dapat diatasi oleh antioksidan endogen, sehingga MDA akan tetap ada dalam tubuh (Valko, *et al.*, 2007; Latifa, 2015).

Peningkatan kadar MDA diakibatkan oleh pemberian CCl₄. CCl₄ yang diinduksikan ke hewan coba memiliki efek toksik karena dapat memicu

produksi peroksidasi lipid pada membran lipid. Peroksidasi lipid yang diakibatkan oleh radikal bebas $\text{CCl}_3\cdot$ dan $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ dapat mengakibatkan kerusakan struktur membran sel hepatosit karena radikal bebas yang melepaskan hidrogen dari PUFA (Kuzu, *et al.*, 2007). Proses pemecahan ikatan pada PUFA tersebut dapat menginduksi *microsome* platelet untuk menghasilkan *Malondialdehyde* (MDA) dalam jumlah besar (Singh, 2014).

Penurunan kadar MDA secara signifikan terjadi pada semua kontrol terapi. Penurunan kadar MDA terhadap kontrol positif pada kelompok terapi 1 dengan dosis 200 mg/kgBB sebesar 23,5%. Pada kelompok terapi 2 dengan dosis terapi 400 mg/kgBB sebesar 40,7%. Pada kelompok terapi 3 dengan dosis terapi 800 mg/kgBB sebesar 56,3% yang merupakan hasil terbaik penurunan kadar MDA. Penurunan kadar MDA pada kelompok terapi setelah pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* yang digunakan sebagai terapi fibrosis hepar memiliki kandungan antioksidan berupa isoflavon menggunakan metode LC-MS (**Lampiran 15**). Turunan isoflavon yang teridentifikasi paling tinggi hasil fermentasi kedelai adalah genistein. Peran isoflavon genistein bertanggung jawab pada sintesis SOD (*Superoxide Dismutase*). SOD merupakan salah satu antioksidan endogen yang bekerja dengan cara membersihkan radikal bebas dengan reaksi enzimatik dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Apabila sintesis SOD meningkat, maka terjadi penurunan pembentukan MDA sebagai produk akhir dari peroksidasi lipid (Suarsana, dkk., 2013).

Isoflavon dalam tempe memiliki kemampuan sebagai antioksidan yaitu sebagai pemusnah radikal bebas (*free radical scavenging*) dan mencegah reaksi berantai lebih lanjut terhadap komponen membran sel (Suarsana, dkk., 2013). Mekanisme dari senyawa isoflavon dalam mengurangi pembentukan senyawa radikal dan ROS melalui dua cara yaitu mendonorkan ion hidrogen dari ikatannya dan sebagai *scavenger* (peradam) radikal bebas secara langsung. Isoflavon yang memiliki kemampuan sebagai donor ion hidrogen akan membentuk senyawa yang lebih stabil, sedangkan senyawa isoflavon yang berperan sebagai *scavenger* senyawa ROS, yaitu dengan mendonorkan sebuah elektron ke radikal hidroksil, serta membentuk radikal yang relatif lebih stabil (Astuti, 2008). Senyawa isoflavon yang mengeliminasi radikal bebas dan mencegah reaksi berantai lebih lanjut terhadap komponen membran sel tersebut, sehingga dapat menekan proses peroksidasi lipid yang berlebihan sebagai produk akhir sekaligus juga dapat menurunkan kadar MDA.

Menurut Bahtiar (2017) menyatakan bahwa hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄ dengan dosis 800 mg/kgBB menunjukkan berkurangnya akumulasi kolagen dengan terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) yang diamati pada gambaran histopatologi hepar dengan pewarnaan *Masson Trichome*, yang menunjukkan adanya pengaruh enzim fibrinolitik terhadap degradasi fibrin. Hasil tersebut mendukung bahwa pemberian sari tempe kedelai hitam sebagai agen terapi fibrosis hepar dapat mendegradasi fibrin yang terbentuk sehingga kerusakan fungsi hepar karena fibrosis dapat

diperbaiki. Jadi dosis efektif terapi fibrosis hepar oleh sari tempe kedelai hitam adalah terapi dengan dosis 800 mg/kgBB.

5.3 Pengaruh Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Aktivitas ALP (*Alkaline phosphatase*)

Pengukuran aktivitas *Alkaline phosphatase* pada serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang telah diberi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* ditampilkan pada **Tabel 5.3**.

Tabel 5.3 Rata-rata aktivitas *Alkaline phosphatase* (U/L) serum tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-Rata Aktivitas ALP \pm SD (U/L)	Rata-Rata Aktivitas ALP (%)	Penurunan Aktivitas ALP Terhadap Kontrol Positif (%)
Kontrol Negatif	160,5 \pm 6,24 ^a	47,5	52,5
Kontrol Positif	337,2 \pm 14,7 ^d	100	-
Kelompok Terapi 1 (200 mg/kgBB)	257,5 \pm 5,44 ^c	76,4	23,6
Kelompok Terapi 2 (400 mg/kgBB)	194 \pm 4,83 ^b	57,5	42,5
Kelompok Terapi 3 (800 mg/kgBB)	161,2 \pm 6,07 ^a	47,8	52,2

Keterangan:

- Perbedaan notasi a, b, c, d menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,01$) antar kelompok perlakuan.
- Rata-rata aktivitas ALP pada kontrol positif dengan catatan dianggap 100%

Hasil analisa statistik menggunakan *IBM SPSS Statistic 24* menunjukkan bahwa uji normalitas dan homogenitas memiliki hasil data yang terdistribusi

normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji *oneway* ANOVA. Uji *oneway* ANOVA menunjukkan bahwa sari tempe kedelai hitam dapat menurunkan aktivitas ALP secara signifikan. Pada hasil uji *post-hoc* Tukey menunjukkan bahwa kelompok perlakuan sari tempe kedelai hitam memiliki perbedaan yang nyata karena memiliki notasi yang berbeda. Data pada **Tabel 5.3** menunjukkan bahwa aktivitas ALP pada kelompok kontrol negatif yang merupakan kelompok kontrol tanpa induksi CCl₄ memiliki rata-rata aktivitas *Alkaline phosphatase* sebesar $160,5 \pm 6,24$ U/L yang berarti normal. Data pada **Tabel 5.3** menunjukkan bahwa pada kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kgBB sebesar $257,5 \pm 5,44$ U/L, dosis 400 mg/kgBB sebesar $194 \pm 4,83$ U/L dan dosis 800 mg/kgBB sebesar $161,2 \pm 6,07$ U/L lebih tinggi dari pada kelompok positif yaitu sebesar $337,2 \pm 14,7$ U/L. Rata-rata aktivitas ALP pada kelompok terapi dosis 800 mg/kgBB tidak memiliki perbedaan yang nyata dengan kelompok negatif atau sehat, hal ini dapat diartikan bahwa kelompok terapi 800 mg/kgBB mempunyai respon terhadap radikal bebas yang hampir sama dengan kelompok negatif atau merupakan dosis efektif dalam menurunkan aktivitas ALP.

Alkaline phosphatase merupakan salah satu enzim hidrolase yang mengangkut metabolit melintasi membran sel. ALP ini banyak ditemukan di hepar dan tulang. Sedikit diketahui mengenai fungsi fisiologis ALP yang sebagian besar di jaringan, kecuali isoenzim tulang yang memiliki peranan dalam mineralisasi kerangka normal (Gianni, *et al.*, 2005). Nilai aktivitas ALP

pada tikus putih jantan dengan kisaran umur 8-12 minggu sebesar 136-188 U/L dengan rata-ratanya 160,00 U/L (Ginknis and Clifford, 2006).

Peningkatan aktivitas ALP diakibatkan penginduksian CCl₄. CCl₄ merupakan agen toksik yang digunakan untuk membuat kerusakan hepar. CCl₄ dimetabolisme oleh sitokrom P450 menjadi radikal bebas CCl₃[•] dan CCl₃O₂[•]. Radikal bebas tersebut akan meningkatkan stress oksidatif yang berlanjut dapat meningkatkan proses peroksidasi lipid pada membran sel. Radikal peroksidasi lipid, hidroperoksidasi lipid dan produk pemecahan lipid berperan dalam proses oksidasi. Peroksidasi lipid mengakibatkan struktur membran sel dan organel intraseluler rusak. Ketika sel hepar mengalami kerusakan, ALP akan dilepaskan dari jaringan tersebut ke dalam darah sehingga terjadi peningkatan aktivitas ALP (Kuzu, *et al.*, 2007; Haki, 2009). *Alkaline phosphatase* (ALP) adalah enzim yang disintesis oleh sel hepar dan berada dalam membran kanalikuli empedu dalam struktur lobulus hepar, oleh sebab itu ALP disebut juga enzim membran sel, kenaikan aktivitasnya dapat terlibat pada kolestasis dan kerusakan sel hepar (Pramushinta, 2008).

Penurunan aktivitas ALP secara signifikan terjadi pada semua kontrol terapi. Penurunan secara signifikan terhadap kelompok terapi 1 dengan dosis terapi 200 mg/kgBB sebesar 23,6%. Pada kelompok terapi 2 dengan dosis terapi 400 mg/kgBB sebesar 42,5%. Pada kelompok terapi 3 dengan dosis terapi 800 mg/kgBB sebesar 52,2% yang merupakan hasil terbaik penurunan aktivitas ALP. Penurunan aktifitas ALP pada kelompok terapi setelah pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr*) hasil fermentasi

Rhizopus oligosporus diidentifikasi kandungan isoflavonnya menggunakan metode LC-MS (**Lampiran 15**). Kandungan antioksidan yang berupa isoflavon tersebut dapat menangkal radikal bebas yang dapat menekan proses peroksidasi lipid pada membran sel, sehingga menurunkan respon dari sel radang (Beninger, 2003). Proses peroksidasi lipid pada membran sel yang menurun dapat mengurangi kerusakan pada membran sel hepatosit yang berpengaruh pada aktivitas ALP dalam serum yang dilepaskan ke sirkulasi tubuh sehingga menjadi turun (Sofia, 2005).

Sebagian besar kandungan isoflavon pada kedelai atau produk olahan kedelai terdapat dalam bentuk glikosida seperti genistin, daidzin dan glisitin yang berkonjugasi dengan mengikat satu molekul gula. Ketika produk kedelai tersebut difermentasi, bentuk glikosida isoflavon didegradasi menjadi senyawa aglikon dalam bentuk bebas yang dihasilkan oleh pelepasan glukosa dari glikosida. Proses degradasi glikosida menjadi aglikon seperti genistein, daidzein dan glisitein dikatalis oleh enzim glukosidase dalam usus halus. Isoflavon dalam bentuk aglikon lebih mudah diserap oleh usus halus, kemudian isoflavon didistribusikan melalui darah menuju ke hati. Ekskresi akhir terjadi pada feses dan urin (Astuti, 2008).

Selain mengandung antioksidan isoflavon, juga mengandung enzim fibrinolitik yang telah diuji menggunakan Uji Cakram Fibrin. Pada hasil uji cakram fibrin, zona jernih yang terbentuk semakin lebar dan jelas menunjukkan bahwa semakin banyak fibrin yang terhidrolisis oleh enzim fibrinolitik dari sari tempe kedelai hitam yang diinokulasikan (**Lampiran 16**). Kandungan enzim

fibrinolitik dari tempe tersebut akan mendegradasi fibrin melalui mekanisme meningkatkan jumlah alteplase (t-PA) sebagai aktivator dari plasminogen. Plasminogen yang aktif akan berubah menjadi plasmin dan mendegradasi fibrin menjadi *fibrin degradation product*. Sehingga dapat mengurangi produksi ECM yang menyebabkan fibrin tersebut dan penyakit fibrosis hepar dapat teratasi. Hal tersebut dapat menjadikan tempe kedelai hitam berpotensi sebagai kandidat agen fibrinolitik serta sumber antioksidan yang baik (Mine, *et al.*, 2004).

Berdasarkan rata-rata aktivitas ALP (**Tabel 5.3**) bahwa pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* sebagai terapi dapat menurunkan aktivitas ALP. Semakin tinggi dosis terapi yang diberikan, maka semakin besar pula penurunan nilai aktivitas ALP pada serum. Dosis efektif terapi fibrosis hepar oleh sari tempe kedelai hitam adalah terapi dengan dosis 800 mg/kgBB.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* pada tikus model fibrosis hepar hasil induksi CCl₄ dapat menurunkan kadar MDA dengan dosis efektif 800 mg/kgBB yang ditunjukkan adanya penurunan secara signifikan sebesar 56,3% terhadap kontrol positif.
2. Sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* pada tikus model fibrosis hepar hasil induksi CCl₄ dapat menurunkan aktivitas ALP dengan dosis efektif 800 mg/kgBB yang ditunjukkan adanya penurunan secara signifikan sebesar 52,2% terhadap kontrol positif.

6.2 Saran

Penelitian lanjutan perlu dilakukan berkaitan dengan pengisolasian enzim fibronolitik secara kuantitatif untuk mengetahui derajat kemampuan sari tempe kedelai hitam sebagai terapi fibrosis hepar dalam mendegradasi fibrin serta uji toksisitas sari tempe kedelai hitam terhadap tikus (*Rattus novergicus*).

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J. W., P. Baird, R. H. Davis, S. Ferreri, M. Knudtson, A. Koraym, V. Waters, C. L. Williams. 2009. Health Benefits of Dietary Fiber. International Life Institute. *Nutrition Reviews* Vol. 67 (4): 188-205.
- Anom, T dan D. Wibawa. 2010. Pendekatan Diagnosis dan Terapi Fibrosis Hati. *J Peny. Dalam*, 11 (1).
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web Online. at: [//animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/). [06 Juni 2017].
- Astuti, Sussi. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*, 13 (2).
- Atun, S. 2009. Potensi Senyawa Isoflavon dan Derivatnya dari Kedelai (*Glycine Max. L*) Serta Manfaatnya Untuk Kesehatan. Prosiding Seminar Nasional Penelitian. Yogyakarta: Fakultas MIPA Universitas Negeri Yogyakarta
- Bahtiar, Eki. 2017. Pengaruh Sari Tempe Kedelai Hitam Hasil Fermentasi *R. Oligosporus* pada Tikus Model Fibrosis Hepar Hasil Induksi CCl₄ Terhadap IL-1 dan Histopatologi Hepar [Skripsi] Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Bataller, R., Brenner, D., Miscellaneous, E. 2009. *Overview of Liver Fibrosis: Textbook of Gastroenterology*, fifth Edition. Blackwell Science Ltd., London 658 – 79.
- Beninger, C. W and L. H. George. 2003. Antioxidant Activity of Extract, Condensed Tannin fraction, and Pure Flavonoids from lxx *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7879 – 7883.
- Botros, M. and K. Sikaris. The De Ritis Ratio: The Tesf of Time. *Clin Biochem Rev* 34: 117-130
- Constandinou, C., N. Henderson, J. P. Iredale. 2005. Modeling Liver Fibrosis in Rodents. *Methods in Molecular Medicine* 117: 237-250.
- Firmansyah, R., R. Hakim, D. Damayanti. 2015. Efek Antihipertensi Dekokta Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) Melalui Penghambatan ACE (Studi *In Silico*). *Jurnal Kedokteran Komunitas* 3(1): 200-208.

- Friedman, S. L., Rockey, D. C., Bissell, D. M. 2007. Hepatic Fibrosis 2006: Report of the Third AASLD Single Topic Conference. *J Hepatology* 45; 242-249.
- Gaze, D.C. 2007. The Role of Existing and Novel Cardiac Biomarkers for Cardioprotection. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 8(9): 711 – 723.
- Ganda, R. P. 2007. Pengaruh Pemberian Karbon Tetrachloride Terhadap Fungsi Hepar dan Ginjal Tikus. *Makara, Kesehatan*, 11: 11-16.
- Giannini, E., R. Testa, V. Savarino. 2005. Liver Enzyme Alteration: A Guide for Clinicians. *CMAJ* 1: 172 (3).
- Giboney, P.T. 2005. Mildly Elevated Liver Transaminase Levels In the Asymptomatic Patient. *Am Fam Physician*, 71 (6).
- Ginknis, M. A. Clifford. B. Charles. 2006. *Clinical Laboratory Parameters for Rats*. Wilmington: Charles River Lab.
- Grotto, Denise., Lucas Santa Maria., Juliana Valentini., Clóvis Paniz., Gabriela Schmitt., Solange Cristina Garcia., Valdeci Juarez Pomblum. 2009. Importance of the Lipid Peroxidation Biomarkers and Methodological Aspects for Malondialdehyde Quantification. *Quím. Nova* 32(1) São Paulo.
- Haki, Mohandis. 2009. Efek Ekstrak Daun Talok Terhadap Aktivitas Enzim SGPT pada Mencit yang diinduksi Karbon Tetraklorida [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret.
- Halliwell, B and J.M.C. Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth edition*. New York: Oxford University Press.
- Hartono, Nurwati, I., Ikasari, F., dan Wiryanto. 2005. Pengaruh Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma Domestica* Val.) Terhadap Peningkatan Kadar SGOT dan SGPT Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Akibat Pemberian Asetaminofen. *Jurnal Biofarmasi*, 3 (2): 57 – 60.
- Hubscher, S. G. 2006. Histological Assessment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Histopathology*. 49: 450-456.
- Juhryyah, S. 2008. Gambaran Histopatologi Organ Hati dan Ginjal Tikus Pada Intoksikasi Akut Insektisida (*Metofluthrin*, *D-phenothrin*, *D-Alletrin*) dengan Dosis Bertingkat. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Jeremy, E. K. 2009. Alkaline Phosphatase. <http://www.darkslow.com> [14 Juni 2017].

- Jeon, T. I., S. G. Hwang, N. G. Park, Y. R. Jung, S. I. Shin, S. D. Choi, D. K. Park. 2003. Antioxidative Effect of Chitosan on Chronic Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury in Rats. *Toxicology*. 187:67-73.
- Latifa, Ken Inayati. 2015. Profil Kadar MDA (*Malondialdehida*) pada Tikus yang diberikan Ekstrak Herba Thymi (*Thymus vulgaris* (L.)) [Skripsi]. Fakultas Parmasi. Universitas Muhammadiyah.
- Kasmidjo, R.B. 1990. *Tempe: Mikrobiologi dan Kimia Pengolahan serta Pemanfaatannya*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Kevin C, Kregel, Hannah J, Zhang. 2006. An Integrated View of Oxidative Stress in Aging: Basic Mechanisms, Functional Effects, and Pathological Considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R18-R36.
- Kirsch, J.D. 2001. *Free Radical and Radiation Biology Program*. Iowa City: The University of Iowa Pr.
- Klaassen, C. D. 2008. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York: McGraw-Hill 557-562.
- Krisnansari, D., Sulisty, H., Kusdaryantoi, W. D. 2014. Potensi Hepatoprotektor Propolis Terhadap Hepar Tikus Putih (*Rattus novvergicus*) yang Diinduksi Karbon Tetraklorida. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Jendral Soedirman: Purwokerto.
- Korhonen, H and Pilanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and Functionality. *Jokioinen, Finland. International Dairy Journal* 16, 945-960.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kustyawati, Maria Erna. 2009. Kajian Peran Yeast Dalam Pembuatan Tempe. *Agritech*, 29(2).
- Kuzu, N., K. Metin, A. Dagli. 2007. Protective Role of Genistein in Acute Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride. *Hindawi Publishing Corporation*.
- Martin P, Friedman LS. 2004. Antioxidant and Hepatoprotective Effect *Acanthopanax Senticosus*. *Phytoteraphy Research* 14: 489-494.
- Murray, K. R., K.G. Daryl and Victor, W. R. 2009. *Biokimia Harper edisi ke- 27*. Terjemahan: *Herpers Biochemistry*. Alih Bahasa: Andry Hartono. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

- Mayasari, S. 2010. Kajian Karakteristik Kimia dan Sensori Sosis Tempe Kedelai Hitam dan Kacang Merah dengan Bahan Biji Berkulit dan Tanpa Kulit [Skripsi]. Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret.
- Mine, Y. A. Wong, B. Jiang. 2004. Fibrinolytic Enzymes in Asian Traditional Fermented Foods. *Food Research International* (38): 243-250
- Mormone, E., J. George, N. Nieto. 2011. Molecular Pathogenesis of Hepatic Fibrotic and Current Therapeutic Approaches. *ELSEVIER Journal of Chemico-Biological Interaction* 193: 225-231
- Nurhidajah. 2010. Aktivitas Antibakteri Minuman Fungsional Sari Tempe Kedelai Hitam Dengan Penambahan Ekstrak Jahe. *Jurnal Pangan dan Gizi*, 1(2).
- Nurrahman. 2015. Evaluasi Komposisi Zat Gizi dan Senyawa Antioksidan Kedelai Hitam dan Kedelai Kuning. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 4(3).
- Panjaitan, R.G.P. 2008. Pengujian Aktivitas Hepatoprotektor Akar Pasak Bumi (*Eurycoma Longifolia* Jack). [Disertasi]. Institusi Pertanian Bogor.
- Pertiwi, P. A dan Widyaningsih, W. 2015. Efek Ekstrak Etanol Ganggang Hijau (*Ulva Lactuca* L.) Terhadap Aktivitas SGOT-SGPT Pada Tikus. *Trad, Med, J.*, 20(1): 1-6.
- Poernomo, A., Isnaeni, Purwanto. 2015. Aktivitas Invitro Enzim Fibrinolitik Fermentasi *Rhizopus oligosporus* ATCC 6010 Pada Substrat Kedelai Hitam. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 4 (2).
- Pramushinta, A.A. 2008. Pengaruh Pemberian Teh Hijau Terhadap Kadar Enzim Alkaline Phosphatase Serum Tikus Wistar yang Diberi Kloramfenikol. [Skripsi] Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.
- Price, S. A and Wilson, L. M. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Purwoko, T. 2004. Kandungan Isoflavon Aglikon pada Tempe Hasil Fermentasi *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*: Pengaruh Perendaman. *BioSMART* Vol. 6 (2): 85-8.
- Ralston L. 2005. Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I And II Chacone Isomerase. *Plant physiology*, 137: 1375-1388.
- Recknagel, R.O., Glende, E.A., Dolak, J.A., Waller, R.L. 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43: 139-154
- Rockey, D. 2006. Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. *Hepatology* 43: S113-S120.

- Rukmana, S. K. dan Y. Yuniarsih. 1996. *Kedelai, Budidaya Pasca Panen*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Singh, Z. 2014. Use of *Malondialdehyde* as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Diferent Disease Pathologies: A Review. *Iranian Journal Public Health*, 43 (3): 7-16.
- Shanmugasundaram, P and Venkataram, S. 2006. Hepatoprotektive and Antioxidant Effect of *Hygrophilla auriculata* (K. Schum) Heine *Accanthaceae* Room Extract. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 124 – 128.
- Sharma Naveen., Jain AK., Sharma Vipin., Jain Suman., Saluja Gurdeep. 2012. Hepatoprotective Effect of Methanolic Extract of *Hedyotis Herbacea* Linn In CCl_4 Treated Male Rats. *International Research Journal of Pharmacy* 2012, 3(10).
- Sherwood, L. 2009. *Human Physiology: From Cells to System 7th Edition*. Belmont: Brooks/Cole.
- Sloane, E. 2004. *Anatomi dan fisiologi untuk Pemula*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Snell, R.S. 2006. *Anatomi Klinik Untuk Mahasiswa Kedokteran edisi ke-6*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Sofia, D. 2005. Antioksidan dan Radikal Bebas. http://www.chem-is-try.org/artikel_kimia/berita/antioksidan_dan_radikal_bebas/. [12 Desember 2017].
- Suarsana, I., T. Wresdiyati, A. Suprayogi. 2013. Respon Stress Oksidatif Dan Pemberian Isoflavon Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase Dan Peroksidasi Lipid Pada Hati Tikus. *JITV* 18(2): 146-152
- Suckow, M.A., H. Steven, C. L. Franglin. 2006. *The Laboratory Rat Second Edtion*. A volume in American Coolege of Laboratory Animal Medicine. Academic Press.
- Sugimoto. 2007. The Fibrinolytic Activity of a Novel Protease Derived from Tempeh Producing Fungus, *Fusarium Sp.* BLB. *Jurnal Biosci Biotechnol Biochem Japan* 71 (9): 2184-2189
- Surya, Hermawan. 2009. Efek Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Kadar Enzim SGOT dan SGPT Pada Mencit Dengan Induksi Karbon Tetraklorida. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret.

- Suwandi, T. 2012. Pemebrian Ekstrak Kelopak Bunga Rosela Menurunkan Malondialdhyda Pada Tikus Yang diberi Minyak Jelantah [Tesis]. Program Studi Ilmu Biomedik. Universitas Udayana.
- Treuting, P.M., Suzanne M.D and Kathleen S.M. 2018. *Comparative Anantomy and Histology: A mouse, Rat adn Human Atlas*. London: Academic Press.
- Vattem, D. A and Shetty, K. 2003. Ellagic Acid Production and Phenolic Antioxidant Activity in Cranberry Pomace (*Vaccinium Macrocarpon*) Mediated by Lentinus Edodes Using a Solid-State System. *Process Biochemistry*, 39(3), 367–379.
- Walace, K., A. Burt, M. Wirght. 2008. Liver Fibrosis. *Biochemical J*. 411:1-8.
- Warisno, D. 2010. *Meraup Untung dari Olahan Kedelai*. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Weber, L., M. Boll, A. Stampfl. 2003. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological model. *Toxicology*. 33(2): 105-1036.
- Widodo, M. A. 1995. Efek Pemicu Radikal Bebas Dan Vitamin E Pada Diabetes Bagian ilmu penyakit dalam fakultas kedokteran Komplikasi Pembuluh Darah Tikus Diabetes. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun 1992-1995*. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.
- Xu, B. J and S. K. S. Chang. 2007. A Comporative Study on Phenolic Profils and Antioxidant of Legums as Affected by Extraction Solvent. *J. Food Sci.*, 72(2):159-166.